



УДК 577.114:547.458.88:543.422.25:612.112.3:576.382

СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕМНАНА, ПЕКТИНА ИЗ *Lemna minor* L.

© 2000 г. Р. Г. Оводова[#], В. В. Головченко, А. С. Шашков*, С. В. Попов, Ю. С. Оводов

Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, 167982, Сыктывкар, Первомайская, 50;

* Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 117913, Москва, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 11.04.2000 г. Принята к печати 08.06.2000 г.

Из свежесобранной ряски *Lemna minor* L. выделен и охарактеризован пектиновый полисахарид, ранее названный нами лемнаном. Показано, что в состав углеводной цепи лемнана входят в качестве основных составляющих остатки *D*-галактуроновой кислоты (64%), галактозы, арабинозы, ксилозы и разветвленного моносахарида – *D*-апиозы. Содержание последнего составляет около 25%, что указывает на принадлежность лемнана к апиогалактуроновым пектинам, подобным зостерану, пектину морских трав сем. *Zosteraceae*.

Результаты частичного кислотного гидролиза, расщепления лемнана пектиназой, а также данные спектроскопии ЯМР свидетельствуют о том, что макромолекула лемнана содержит участки линейного α -1,4-*D*-галактуронана и разветвленного апиогалактуронана. Боковая цепь апиогалактуронана состоит из одиночных и 1,5-связанных остатков *D*-апиофуранозы, присоединенных по 2-му и 3-му положению остатков *D*-галактуроновой кислоты главной цепи. Показано, что лемнан обладает иммунотропным действием, направленным на усиление активности системы фагоцитоза.

Ключевые слова: полисахариды растений; пектины; апиогалактуронаны; лемнан; *Lemna minor* L.; спектроскопия ЯМР пектинов; иммуномодуляторы.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее [1] из морских трав, широко распространенных в зоне сублиторали морей Мирового океана, выделен зостеран, уникальный пектин, построенный из фрагментов апиогалактуронана, рамногалактуронана и гетерогликаногалактуронана [2, 3]. Установлено частичное строение зостерана [4] и показано, что входящий в его состав апиогалактуронан имеет главную углеводную цепь α -1,4-*D*-галактуронана и боковые цепи из единичных остатков *D*-апиозы, присоединенных по 2-, 3- и 2,3-положениям *D*-галактуроновой кислоты.

Зостеран обладает высокой гелеобразующей способностью [5] и широким спектром физиологической активности [6, 7].

Представляют значительный интерес поиски других источников полисахаридов, близких по структуре и свойствам зостерану. В этой связи следует указать на данные [8–10] по выделению и предварительной характеристике апиогалактуронанов из ряски *Lemna minor*. По-видимому, апиогалактуронан является лишь фрагментом основного полисахарида *L. minor*, имеющего более сложное строение и названного нами ранее лемнаном [11]. Настоящая статья посвящена выделению, предварительной структурно-химической харак-

теристике лемнана и изучению его физиологической активности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Лемнан в качестве основного пектинового полисахарида был выделен из свежесобранного растительного материала, заготавливаемого ежемесячно в период с июня по октябрь в окрестностях Сыктывкара. Собранный материал предварительно обрабатывали водным формалином для связывания пигментов, протопектин разрушали разбавленной соляной кислотой, а фракцию пектиновых полисахаридов получали экстракцией растительного сырья 0.7% водным оксалатом аммония с последующим осаждением этанолом. Полученный суммарный препарат растворяли в воде, диализовали и лиофилизировали. Дальнейшее фракционирование исходного лемнана с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе привело к получению очищенного лемнана, $[\alpha]_D^{20} +113.3^\circ$ (с 0.1; H₂O), в минорного компонента, имеющего одинаковый с лемнаном качественный моносахаридный состав, но с более высоким содержанием остатков галактуроновой кислоты. Показано, что исходный лемнан дает вязкие водные растворы (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что в период с июня по октябрь наблюдается увеличение вязкости молеку-

[#] Автор для переписки (тел./факс: (8212) 421001; e-mail: ovoys@physiol.komisc.ru).

Таблица 1. Выход, удельная вязкость, молекулярная масса и аналитические данные для лемнана в зависимости от времени сбора ряски

Время сбора ряски	Выход лемнана, %	[η]	\overline{M}_n , кДа	Содержание, %						
				белка	GalA	Api	Ara	Gal	Rha	Xyl
Июнь	12.5	0.13	18.6	1.0	35	10.9	3.4	5.7	2.2	4.0
Июль	13.5	0.16	24.3	1.5	43	8.9	0.6	2.2	1.9	1.3
Август	10.0	0.21	31.5	2.0	51	19.1	4.1	5.0	2.5	4.0
Сентябрь	9.4	0.26	41.7	2.0	51	19.4	3.4	4.3	2.2	4.1
Октябрь	8.4	0.32	53.4	сл	64	19.6	3.9	4.9	3.2	3.7
Октябрь*	7.5	н.о.**	н.о.**	сл	65	24.7	1.8	3.2	2.9	1.5

* Очищенный лемнан.

** Не определяли.

лярной массы и содержания галактуроновой кислоты в образцах полученного лемнана. Для дальнейшей работы нами был использован очищенный лемнан, который выделяли из растительного сырья, заготовленного в сентябре–октябре.

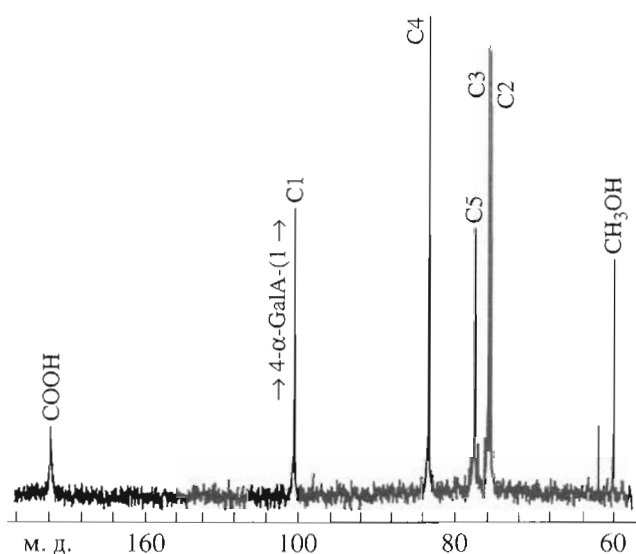
При полном кислотном гидролизе лемнана в качестве главных компонентов образуются галактуроновая кислота, апиоза, галактоза, арабиноза, рамноза и ксилоза. В гидролизате исходного лемнана обнаружены также следовые количества глюкозы, которые, вероятно, входят в состав сопутствующего нейтрального полисахарида, частично извлекаемого в процессе выделения исходного лемнана. Данные по определению количественного моносахаридного состава лемнана, полученные с помощью газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ), приведены в табл. 1.

Частичный гидролиз лемнана трифторуксусной кислотой в концентрации от 0.01 до 0.2 М да-

ет разный набор полисахаридных фрагментов и низкомолекулярных соединений. Мягкий гидролиз 0.01 М трифторуксусной кислотой приводит к появлению в гидролизате только пиозы, что может свидетельствовать о терминальном расположении статков этого моносахарида или о наличии боковых цепей, состоящих только из этих моносахаридных остатков. Апиоза была выделена в индивидуальном состоянии, ее удельное вращение, $[\alpha]_D^{20} + 5.4^\circ$ (с 1.0; H₂O), указывает на принадлежность данного моносахарида к D-ряду.

Качественный и количественный анализ моносахаридного состава полисахаридных фрагментов, образующихся в результате мягкого частичного гидролиза, показал, что они содержат все моносахаридные составляющие исходного пектина. Частичный гидролиз кислотой в концентрации 0.1 М и выше (до 0.2 М) приводит к образованию галактуронана (LM-1) ($[\alpha]_D^{20} + 259^\circ$ (с 0.1; водн. аммиак)), свободного от нейтральных моносахаридов, которые, как показано выше, присутствуют в полном гидролизате. Это свидетельствует о том, что галактуронан представляет собой главную цепь макромолекулы лемнана. Высокое положительное удельное вращение галактуронана указывает на D-конфигурацию остатков галактуроновой кислоты. Характерной особенностью полученного галактуронана LM-1 является низкая степень метоксилирования карбоксильных групп остатков D-галактуроновой кислоты. Содержание метоксильных групп составляет около 0.67%.

Спектр ¹³C-ЯМР LM-1 (рис. 1) указывает на присутствие в углеводной цепи фрагмента $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GalA-1} \rightarrow$, который дает сигнал аномального углеродного атома при 100.6 м.д. Положение сигналов остальных атомов остатков D-галактуроновой кислоты соответствует таковому для ¹³C-ЯМР-спектров заведомого $\alpha\text{-1,4-D-галактопиранозилуронана}$ [12, 13]. Кроме того, сигнал

**Рис. 1.** Спектр ¹³C-ЯМР галактуронана LM-1.

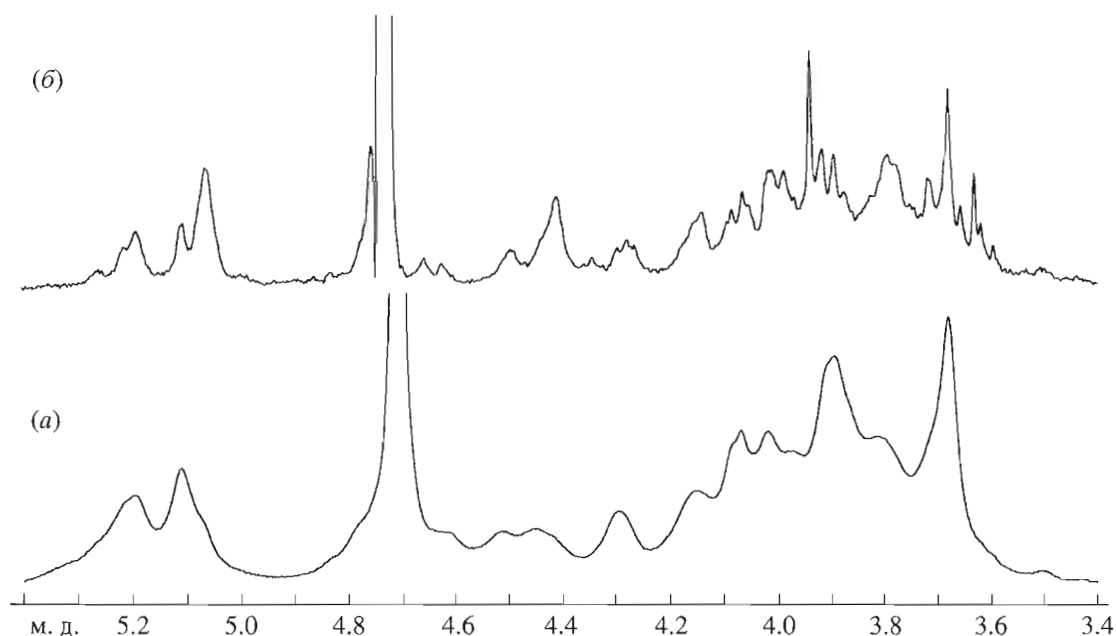


Рис. 2. Спектры ^1H -ЯМР фрагментов лемнана LM-2 (pH 3, а) и LM-3 (pH 9, б), полученных при его ферментативном гидролизе пектиназой.

C6-атома остатков галактуроновой кислоты LM-1 (174.7 м.д.) в спектре ^{13}C -ЯМР галактуронана LM-1 указывает на то, что остатки галактуроновой кислоты преимущественно не несут метоксильных групп [12]. Известно [13], что C6-атом метоксилированной галактуроновой кислоты дает сигнал при 172.4 м.д. в дополнение к сигналу углерода метоксильной группы при 54.1 м.д.

В результате исчерпывающей трехкратной обработки лемнана пектиназой с одновременным диализом получены два фрагмента: из диализата – LM-2 ($[\alpha]_D^{20} +96^\circ$ (с 0.1; H_2O), $D\text{-GalA}$ – 26.5%, $D\text{-Api}$ – 7.4%) и при осаждении этанолом – LM-3

($[\alpha]_D^{20} +105^\circ$ (с 0.1; H_2O), $D\text{-GalA}$ – 75.6%, OMe – 1.22%, Api – 18.4%). Фрагмент LM-2 содержит также остатки всех остальных нейтральных моносахаридов лемнана в количестве 1–3%. Фрагмент LM-3 устойчив к дальнейшему действию пектиназы, его кислотный гидролиз дает только апиозу и галактуроновую кислоту и, таким образом, LM-3 представляет собой апиогалактуронан. Спектры ЯМР полученных фрагментов LM-2 и LM-3 лемнана приведены на рис. 2 и 3, а их интерпретация дана в табл. 2–5.

В спектре ^1H -ЯМР (рис. 2а) LM-2 в области резонанса аномерных протонов имеются три основ-

Таблица 2. Химические сдвиги сигналов протонов, принадлежащих остаткам галактуроновой кислоты и апиозы, в спектре ^1H -ЯМР фрагмента LM-2 при pH 3

Остаток	Химические сдвиги, δ , м.д. (ацетон 2.225 м.д.)				
	H1	H2	H3	H4	H5
$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalpA-(1} \rightarrow$	5.05	3.78	3.99	4.40	4.75
$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalpA-(1} \rightarrow$ 3)	5.05	4.17	4.14	4.50	4.75
\uparrow					
	H1	H2	H4	H4'	H5; H5'
$\rightarrow 5)\text{-}\beta\text{-Api-(1} \rightarrow$	5.10; 5.20 ^{a)}	4.01	4.29	3.88	3.90; 3.69
$\beta\text{-Api-(1} \rightarrow$	5.10; 5.20 ^{a)}	4.01	4.06	3.89	3.68; 3.68

a) Первое значение – для остатка, замещающего $\beta\text{-Api}$ по C5, второе – для остатка, замещающего $\alpha\text{-GalpA}$ по C3.

Таблица 3. Химические сдвиги сигналов атомов углерода остатков галактурановой кислоты и апиозы в спектре ^{13}C -ЯМР фрагмента LM-2 при pH 3

Остаток	Химические сдвиги, δ , м.д. (ацетон 31.45 м.д.)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
→4)- α -GalpA-(1 →	100.2	69.5	70.3	79.2	72.8	176.7
→4)- α -GalpA-(1 → 3)	100.2	69.5	78.6	77.4	72.8	176.7
↑						
→5)- β -Api-(1 →	110.1; 110.7 ^{a)}	78.0	81.3	75.8	71.3	
β -Api-(1 →	110.1; 110.7 ^{a)}	78.0	80.2	75.2	65.3	

^{a)} Первое значение – для остатка, замещающего β -Api по C5, второе – для остатка, замещающего α -GalpA по C3.

ных дублетных сигнала с константой спин-спинового взаимодействия (КССВ) порядка 4 Гц. Все сигналы в протонном спектре значительно уширены, что не позволяет более точно измерить КССВ. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C были расшифрованы (табл. 2 и 3) при совместном анализе двумерных корреляционных спектров COSY, TOCSY, ROESY и HSQC. Анализ показал, что наиболее интенсивные (и в то же время наиболее уширенные) сигналы принадлежат 1,4-связанным остаткам α -галактопиранозилурановой кислоты. Так, в спектре ROESY имеются корреляционные пики не только для пространственно сближенных в α -пиранозном цикле протонов H1 и H2, но и для протонов H1 и H4, что характерно для 1,4-связанных полисахаридов. Кроме этих основных пиков,

в спектре видны более слабые корреляционные пики для протонов H1 апиозы и протонов при 4.14, 4.60, 3.90 и 3.69 м.д. В спектре HSQC этим протонам отвечают атомы углерода C3, C4 (78.6 и 77.4 м.д.) минорных остатков галактурановой кислоты и C5 (71.3 м.д.) большей части остатков апиозы. Это позволяет предположить, что часть остатков галактурановой кислоты замещена по C3 остатком апиозы или олигосахаридом апиозы, о чем свидетельствует слабopольное смещение в спектре ^{13}C -ЯМР сигналов C3 галактурановой кислоты (78.6 м.д. по сравнению с таковыми в незамещенном остатке при 70.3 м.д.). О наличии коротких цепей из остатков апиозы свидетельствует двойной набор сигналов H1, H4, H4' и H5, H5' в протонном спектре и C1, C3, C4 и C5 в углеродном

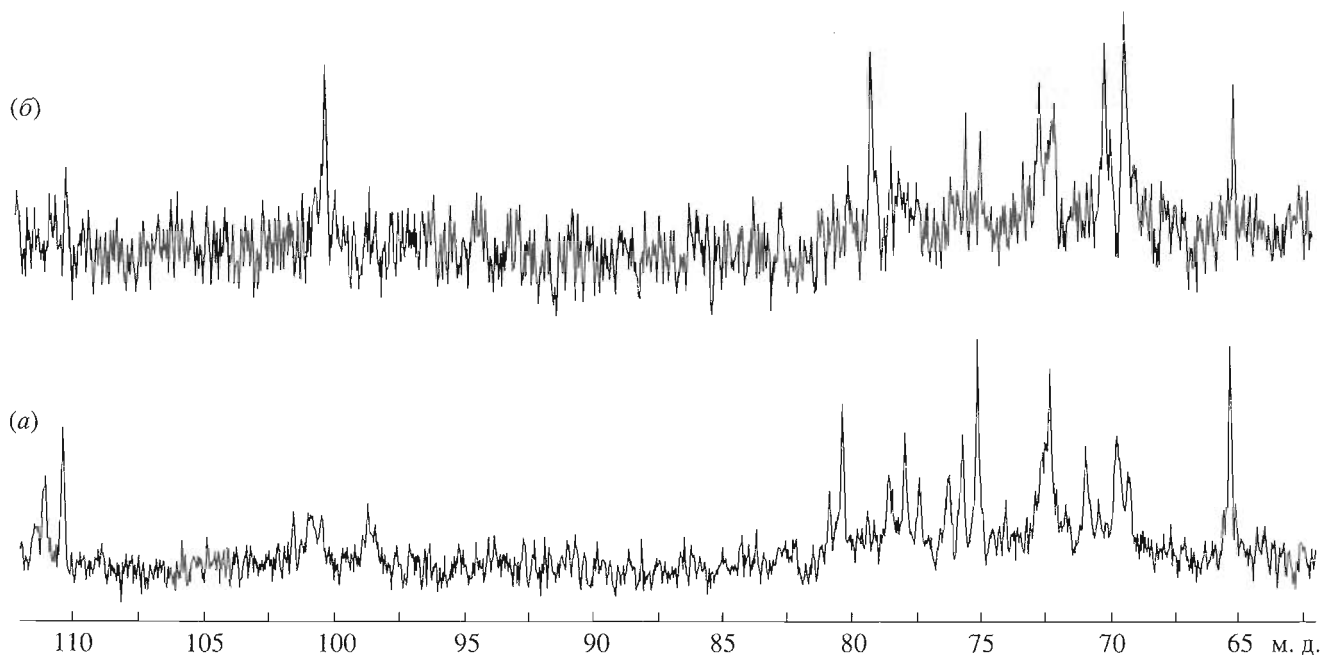


Рис. 3. Спектры ^{13}C -ЯМР фрагментов LM-2 (pH 3, а) и LM-3 (pH 9, б).

Таблица 4. Химические сдвиги сигналов протонов, принадлежащих остаткам галактуроновой кислоты и апиозы, в спектре ^1H -ЯМР апиогалактуронана LM-3 при pH 9

Остаток	Химические сдвиги, δ , м.д. (ацетон 2.225 м.д.)				
	H1	H2	H3	H4	H5
$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalpA-(1}\rightarrow$	5.10	3.80	3.98	4.43	4.61; 4.76 ^{b)}
$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalpA-(1}\rightarrow$ 3)	5.10	4.19	4.16	4.52	4.61; 4.76 ^{b)}
\uparrow					
$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalpA-(1}\rightarrow$ 2)	5.22	3.81	4.01	4.43	4.61; 4.76 ^{b)}
\uparrow					
	H1	H2	H4	H4'	H5; H5'
$\rightarrow 5)\text{-}\beta\text{-Api-(1}\rightarrow$	5.11; 5.20 ^{a)}	4.01	4.30	3.89	3.92; 3.72
$\beta\text{-Api-(1}\rightarrow$	5.11; 5.20 ^{a)}	4.01	4.06	3.91	3.68; 3.68

a) Первое значение – для остатка, замещающего β -Api по C5, второе – для остатков, замещающих α -GalpA по C2 или C3.

b) Первое значение – для остатков, гликозилированных остатком α -GalpA, незамещенным апиозой или замещенным апиозой по C3, второе – для остатков, гликозилированных остатком α -GalpA, замещенным апиозой по C2.

спектре (табл. 2 и 3). Тип 1,5-замещения в таких цепях следует из слабополюного химического сдвига C1 замещающего остатка апиозы (110.1 м.д.) и C5 замещенных остатков (71.3 м.д.).

Как видно из рис. 3а, спектр ^{13}C -ЯМР LM-2 содержит в области резонанса аномерных атомов углерода интенсивный сигнал при 100.2 м.д. и два слабых сигнала (110.1 и 110.7 м.д.), характерных для фуранозидов с *транс*-расположением заместителей при C1 и C2 [14]. Тест на присоединенные протоны (АРТ-спектр [15]) указывает на то, что в области резонанса атомов углерода, связанных с одним атомом кислорода, имеются четыре сигнала CH_2 -групп при 75.2, 75.8, 71.3 и 65.3 м.д. и два слабых сигнала четвертичных атомов углерода при 80.2 и 81.3 м.д. В слабом поле наблюдается сигнал CO-группы при 176.7 м.д., соответствующий неметоксилированному карбоксилу остатков GalA.

Для LM-3 ^1H - и ^{13}C -спектры ЯМР при pH 3 характеризуются разрешением, недостаточным для детального анализа. Подщелачивание растворов до pH 9 с помощью раствора NaO^1H в $^2\text{H}_2\text{O}$ привело к существенному сужению спектральных линий (рис. 2б и 3б), что позволило провести те же двумерные ЯМР-эксперименты, что и для фрагмента LM-2.

В спектре ^{13}C -ЯМР (рис. 3б) LM-3 в области резонанса аномерных атомов остатков α -GalpA наблюдается несколько сигналов, один из которых имеет необычно сильнополюный по сравнению с остальными сдвиг 98.5 м.д. Такое смещение сигналов C1 характерно для β -эффекта замеще-

ния по C2 соответствующего остатка. Анализ двумерных спектров подтвердил замещение части остатков α -GalpA в LM-3 по C2 апиозой (табл. 4, 5). Остальные детали структуры LM-2 и LM-3, судя по спектрам ЯМР (ср. табл. 2, 3 и 4, 5), являются общими для обеих фракций. Небольшие различия в химических сдвигах для одних и тех же фрагментов могут быть объяснены различающимися условиями съемки.

Таким образом, лемнан, пектин ряски малой, имеет в макромолекуле участки α -1,4-*D*-галактуронана и апиогалактуронана. Последний представляет собой разветвленный полисахарид, имеющий главную углеводную цепь из остатков α -1,4-связанной *D*-галактопиранозилурановой кислоты с низкой степенью метоксилирования и боковые цепи, присоединенные во 2- и 3-положения остатков GalpA главной цепи и состоящие из единичных или 1,5-связанных остатков *D*-апиофуранозы. Следовательно, подобно зостерану, лемнан является апиогалактуроновым пектином с низкой степенью метоксилирования карбоксильных групп остатков *D*-галактуроновой кислоты. С последним обстоятельством, скорее всего, связана способность полисахаридов образовывать Ca^{2+} -мостики между отдельными макромолекулами, что приводит к созданию сложной водонерастворимой и очень устойчивой системы протопектина, обуславливающей рост и обитание в водной среде цветковых растений, содержащих эти пектины. Выяснение остальных структурных особенностей макромолекулы лемнана требует дальнейшего исследования.

Таблица 5. Химические сдвиги сигналов атомов углерода остатков галактуроновой кислоты и апиозы в спектре ¹³C-ЯМР апиогалактуронана LM-3 при pH 9

Остаток	Химические сдвиги, δ, м.д. (ацетон 31.45 м.д.)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
→4)-α-GalpA-(1 →	101.3; 100.8; 100.5 ^{a)}	69.6	70.8	80.3	72.2; 72.5 ^{b)}	176.7
→4)-α-GalpA-(1 → 3)	101.3; 100.8; 100.5 ^{a)}	69.1	78.4	77.2	72.2; 72.5 ^{b)}	176.7
↑						
→4)-α-GalpA-(1 → 2)	98.5	76.0	70.3	80.3	72.2; 72.5 ^{b)}	176.7
↑						
→5)-β-Api-(1 →	110.2; 110.8; 111.2 ^{c)}	77.8	80.2; 80.6 ^{d)}	75.5	72.1	
β-Api-(1 →	110.2; 110.8; 111.2 ^{c)}	77.8	80.2; 80.6 ^{d)}	74.9	65.1	

a) В зависимости от наличия и положения апиозы в соседних остатках α-GalpA.

b) Первое значение – для остатков, гликозилированных остатком α-GalpA, незамещенным апиозой или замещенным апиозой по C3, второе – для остатков, гликозилированных остатком α-GalpA, замещенным апиозой по C2.

c) Первое значение – для остатка, замещающего β-Api по C5, второе для остатка, замещающего α-GalpA по C3, третье – для остатка, замещающего α-GalpA по C2.

d) Первое значение – для остатка, замещающего β-Api по C5 или α-GalpA по C3, второе – для остатка, замещающего α-GalpA по C2.

Иммунотропную активность лемнана определяли по влиянию на фагоциты периферической крови и на макрофаги брюшной полости мышей при пероральном введении [16, 17], про-

Таблица 6. Влияние лемнана на фагоциты периферической крови лабораторных мышей при пероральном введении*

Животные (n 7)	Число лейкоцитов в крови, клетки в мкл	Содержание нейтрофилов в крови, %	Фагоцитарный индекс, %
Контроль	3530 ± 1400	31 ± 8	43 ± 4
Опыт	1580 ± 700**	39 ± 8	57 ± 8**

* Данные представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение.

** Различия достоверны в сравнении с контролем при $p < 0.01$ (по U-критерию Уилкоксона).

Таблица 7. Влияние лемнана на макрофаги брюшной полости лабораторных мышей при пероральном введении*

Животные (n 7)	Число лейкоцитов в смыве из брюшной полости, клетки в мкл	Миелопероксидазная активность, OE ₄₉₂ × 1000	Фагоцитарный индекс, %
Контроль	2650 ± 1215	426 ± 199	34 ± 6
Опыт	1850 ± 710**	377 ± 133	47 ± 12**

* OE₄₉₂ – оптическое поглощение при 492 нм. Данные представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение.

** Различия достоверны в сравнении с контролем при $p < 0.01$ (по U-критерию Уилкоксона).

водя количественный подсчет выделенных лейкоцитов [18].

При этом показано, что количество лейкоцитов в периферической крови и в смыве из брюшной полости у мышей, получавших лемнан в дозе 10 мг/день в течение двух недель, снижается вдвое в сравнении с контрольными животными (табл. 6, 7). Можно предположить, что под действием лемнана происходит задержка и накопление лейкоцитов в селезенке, печени, лимфатических узлах. Установлено, что лемнан стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови (табл. 6) и макрофагов в брюшной полости (табл. 7) на 33 и 38% соответственно.

Лизосомальная активность макрофагов, определенная по уровню миелопероксидазы, не изменяется под действием лемнана.

Обнаружено, что лемнан является малотоксичным соединением. Полулетальная доза LD₅₀ лемнана при однократном внутрибрюшинном введении, определенная с помощью экспресс-метода [12], превышает 1000 мг/кг.

Таким образом, лемнан – нетоксичное соединение и обладает иммунотропным действием, направленным на усиление активности фагоцитирующей системы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растительное сырье. Ряску *L. minor* L. заготавливали ежемесячно в период с июня по октябрь с поверхности ряда озер в окрестностях Сыктывкара, Республика Коми. Собранный материал про-

мывали проточной водопроводной водой, удаляли сопутствующие примеси, отжимали воду и полученное свежесобранное растительное сырье использовали для выделения лемнана.

Общие методы. Растворы упаривали в вакууме при температуре не выше 40°C. Величины оптического вращения измеряли в кювете на 1 мл при 20°C на поляриметре Polatronc MNZ (Германия).

Бумажную хроматографию проводили нисходящим методом на бумаге Filtrak FN-12 и FN-13 в системе *n*-бутанол–пиридин–вода (6 : 4 : 3) с индикацией пятен моносахаридов с помощью кислого анилинфталата при 105°C. Содержание белка определяли по ранее описанному методу [20] с калибровочным графиком для бычьего сывороточного альбумина. Количественное определение галактуроновой кислоты проводили с помощью 3,5-диметилфенола как описано ранее [21] с калибровочным графиком для галактуроновой кислоты.

Для спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометр Ultrospec-3000. Моносахариды определяли в виде соответствующих ацетатов полиолов [22] методом ГЖХ на хроматографе Hewlett-Packard 4890 (США), снабженном капиллярной колонкой RTX-1 (0.25 мм × 30 м), с программированием температуры 175 → 250°C (3°/мин). Содержание моносахаридов рассчитывали из площади пиков с использованием молярных коэффициентов и *мио*-инозита в качестве внутреннего стандарта. Спектры ¹³C-ЯМР получали на приборе DRX-500 фирмы Bruker для 3–5% растворов полисахаридов в D₂O при 30°C (внутренний стандарт – ацетон, δ_н 2.225 м.д., δ_с 31.45 м.д.). Для снятия двумерных спектров использовали стандартные методики фирмы Bruker.

Удельную вязкость определяли на вискозиметре Освальда (время протекания растворителя (H₂O) 74.2 с при 25°C), молекулярную массу – по скоростной седиментации и вискозиметрически [23].

Выделение лемнана. Свежесобранный растительный материал, обработанный, как описано выше, заливали 0.5% водным формалином и оставляли на 12–17 ч при 20°C, сырье отделяли, промывали водой и высушивали с помощью фильтровальной бумаги. Полученную массу (450 г) обрабатывали разбавленной соляной кислотой при перемешивании, доводя pH до 4.0, с последующим нагреванием при 50°C в течение 3 ч при постоянном pH 4.0. Обработанный материал промывали водой и трижды экстрагировали 0.7% водным оксалатом аммония (общий объем 3 л) при 68°C в течение 3–5 ч. Фильтраты объединяли, упаривали до небольшого объема, полученную смесь центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20–30 мин. К супернатанту добавляли этанол (4 объема). Выпавший осадок лемнана отделяли центрифугированием, растворяли в дист. воде, диализовали

и лиофилизовали. Выход и характеристика полученных образцов лемнана приведены в табл. 1.

Исходный лемнан (250 мг) растворяли в воде (5 мл) и наносили непосредственно на колонку (2.5 × 40 см) с DEAE-целлюлозой в СГ-форме. Элюировали последовательно водой и растворами хлорида натрия от 0.01 до 0.5 М. Скорость растворителя 42 мл/ч, фракции собирали по 10 мл. Выход полисахаридов контролировали по положительной реакции элюата на углеводы по фенол-сернокислотному методу [24]. Объединенные фракции, соответствующие отдельным пикам, диализовали, концентрировали и лиофилизовали. Основная фракция элюировалась 0.3 М хлоридом натрия. В результате получали очищенный лемнан (132 мг).

Полный кислотный гидролиз. К навеске лемнана (3–5 мг) приливали 1 мл 2 М TFA, содержащей *мио*-инозит (1 мг/мл). Смесь нагревали 5–8 ч при 100°C, кислоту удаляли многократным упариванием досуха с метанолом. Моносахариды идентифицировали методами БХ и ГЖХ. Результаты приведены в табл. 1.

Частичный кислотный гидролиз. К лемнану (5 мг) прибавляли 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 или 0.2 М раствор TFA (по 1 мл в каждую ампулу) и нагревали в запаянных ампулах при 100°C в течение 3 ч. Качественный моносахаридный состав полученных гидролизатов определяли с помощью БХ.

Лемнан (100 мг) нагревали с 0.1 М TFA (5 мл) при 100°C в течение 3 ч, кислоту удаляли упариванием, а реакционную смесь выливали в этанол. Осадок растворяли в воде, диализовали и лиофильно сушили. Получали галактуронан (LM-1), дающий при кислотном гидролизе только *D*-галактуроновою кислоту.

Ферментативный гидролиз. Лемнан (500 мг) растворяли в воде (50 мл), добавляли водный раствор пектиназы (10 мг, Ferba K, Berlin), смесь инкубировали в диализном мешке с одновременным диализом против дист. H₂O (3 ч), меняя диализную воду через каждый час. Диализные воды объединяли, концентрировали, к полученному раствору добавляли 4 объема этанола, выпавший осадок отмывали от свободной галактуроновой кислоты, растворяли в воде и лиофильно сушили. В результате получали фрагмент LM-2 (22.9 мг). Пектиназу дезактивировали кипячением при 100°C в течение 5 мин, раствор центрифугировали, концентрировали и осаждали 4-кратным объемом 96% этанола. Выпавший осадок отделяли центрифугированием и промывали этанолом до отсутствия галактуроновой кислоты. Осадок растворяли в воде, добавляли новую порцию пектиназы и всю операцию повторяли еще дважды, контролируя протекание ферментализации по появлению галактуроновой кислоты в ферментализате. Получили апиогалактуронан LM-3, устойчи-

вый к дальнейшей обработке пектиназой. Выход LM-3 – 77 мг. LM-3 подвергали полному кислотному гидролизу как описано выше. С помощью БХ и ГЖХ обнаруживали в гидролизате лишь апиозу и галактуроновою кислоту.

Определение физиологической активности. Белые лабораторные мыши (половозрелые самцы) получали 0.5% водный раствор лемнана в поилках в течение 15 сут (150 мг лемнана на мышшь).

Опытных и контрольных животных (по 7 особей) забивали, собирали кровь из шейного среза и делали смыв из брюшной полости с помощью фосфатного буферного раствора [18].

Число лейкоцитов подсчитывали с помощью световой микроскопии в камере Горяева. Процентное содержание нейтрофилов в крови устанавливали в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимза.

Поглотительную способность нейтрофилов периферической крови определяли общепринятым способом в цельной крови, используя латекс в качестве объекта фагоцитоза [16]. С помощью светового микроскопа определяли фагоцитарный индекс, как процент нейтрофилов, захвативших латекс, от общего числа нейтрофилов. Перитонеальные макрофаги инкубировали в пластиковых чашках Петри (φ 35 мм) в течение 120 мин при 37°C, после чего удаляли неприлипшие клетки, а полученный монослой использовали для определения фагоцитарного индекса, как описано выше.

Миелопероксидазную активность клеток измеряли спектрофотометрически, используя орто-фенилендиамин (0.4 мг/мл) в качестве субстрата [17]. Оптическое поглощение раствора в лунках измеряли при 492 нм с помощью спектрофотометра PowerWave 200 (BioTek Instruments, США) и выражали в условных единицах ($OE_{492} \times 1000$).

При обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение, среднее квадратичное отклонение. Достоверность различий оценивалась по U-критерию Уилкоксона.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят сотрудников Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва) Усова А.И. за ценные советы, Сенченкову С.Н. и Билан М.И. за помощь в подготовке образцов для снятия спектров ЯМР.

Работа поддержана грантом Научного совета "Химия и технология переработки возобновляемого растительного сырья" (№ 8.1.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ovodova R.G., Vas'kovsky V.E., Ovodov Yu.S.* // Carbohydr. Res. 1968. V. 6. P. 328–332.
2. *Ovodova R.G., Ovodov Yu.S.* // Carbohydr. Res. 1969. V. 10. P. 387–390.
3. *Ovodov Yu.S., Ovodova R.G., Bondarenko O.D., Krasikova I.N.* // Carbohydr. Res. 1971. V. 18. P. 311–318.
4. *Ovodov Yu.S., Ovodova R.G., Shibaeva V.I., Mikhey-skaya L.V.* // Carbohydr. Res. 1975. V. 42. P. 197–199.
5. *Ovodov Yu.S., Ovodova R.G., Sorochan V.D.* // Food Hydrocoll. 1992. V. 6. P. 125–128.
6. *Лоеико Ю.Н., Артюков А.А., Козловская Э.П., Мирошниченко В.А., Еляков Г.Б.* Зостерин. Владивосток: Дальнаука, 1997. С. 41–145.
7. *Оводов Ю.С.* // Биоорганич. химия. 1998. Т. 24. С. 483–501.
8. *Hart D.A., Kindel P.K.* // Biochem. J. 1970. V. 116. P. 569–579.
9. *Kindel P.K., Cheng L., Ade R.B.* // Phytochemistry. 1996. V. 41. P. 719–723.
10. *Cheng L., Kindel P.K.* // Carbohydr. Res. 1997. V. 301. P. 205–212.
11. *Ovodov Yu.S., Ovodova R.G., Popov S.V., Bil'kova T.B.* // Abstracts. XIX Intern. Carbohydr. Symp. San Diego, 1998. P. DP041.
12. *Catoire L., Goldberg R., Pierron M., Morvan C., Hervé du Penhoat C.* // Eur. Biophys. J. 1998. V. 27. P. 127–136.
13. *Odonmazig P., Badga D., Ebringerova A., Alföldi J.* // Carbohydr. Res. 1992. V. 226. P. 353–360.
14. *Bock K., Pedersen C.* // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 83. P. 27–66.
15. *Patt S.L., Shooley J.N.* // J. Magn. Reson. 1982. V. 46. P. 535–539.
16. *Блиндарь В., Зубрихина Г., Круглова Н., Никитина Т.* // Клинич. лаб. диагн. 1996. № 2. С. 18–20.
17. *Пинегин Б.В., Бутаков А.А., Щельцина Т.Л.* Экологическая иммунология. М.: ВНИРО, 1995. С. 106–162.
18. *Хант С.* // Лимфоциты. Методы / Ред. Клаус Дж. М.: Мир, 1990. С. 15–65.
19. *Прозоровский В., Прозоровская М., Демченко В.* // Фармакол. токсикол. 1978. № 4. С. 497–502.
20. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
21. *Usov A.T., Bilan M.I., Klochkova N.G.* // Bot. Marina. 1995. V. 38. P. 43–51.
22. *York W.S., Darvill A.G., McNeil M.A., Stevenson T.T., Albersheim P.* // Meth. Enzymol. 1985. V. 118. P. 3–40.
23. *Нефедов П.П., Лавренко П.Н.* Транспортные методы в аналитической химии полимеров. Ленинград: Химия, 1979. С. 104.
24. *Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F.* // Analyt. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.

Structural Studies and Physiological Activity of Lemnan, a Pectin from *Lemna minor* L.

R. G. Ovodova*[#], V. V. Golovchenko*, A. S. Shashkov**, S. V. Popov*, and Yu. S. Ovodov*

**Institute of Physiology, Komi Science Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,
ul. Pervomaiskaya 50, Syktyvkar, 167982 Russia*

***Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 117913 Russia*

A pectic polysaccharide, lemnan, was isolated from freshly collected duckweed *Lemna minor* L. Its sugar chain was shown to be mainly composed of the residues of *D*-galacturonic acid (64%), galactose, arabinose, xylose, and *D*-apiose, a branched chain sugar. The high content of *D*-apiose (25%) indicated that lemnan is an apiogalacturonan type pectin similar to zosteran, a pectic polysaccharide from a sea phanerogam of the *Zosteraceae* family. The results of partial acidic hydrolysis, pectinase digestion, and NMR studies of lemnan demonstrated that its macromolecule contains regions of the linear α -1,4-*D*-galacturonan and branched apiogalacturonan. The side chains of apiogalacturonan were found to be formed of single and 1,5-linked residues of *D*-apiofuranose attached to 2- and 3-positions of the *D*-galacturonic acid residues of the apiogalacturonan backbone. Lemnan was shown to exhibit an immunomodulatory effect by activating the system of phagocytosis.

Key words: apiogalacturonans, immunomodulators, Lemna minor L., lemnan, NMR spectroscopy of pectins, pectins, plant polysaccharides

[#] *To whom correspondence should be addressed; phone/fax: +7 (8212) 42-1001; e-mail: ovoys@physiol.komisc.ru.*

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 10. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.